

**Die selektive Hämolyse von adulten Erythrozyten
in Mischungen mit fetalen Erythrozyten und
die Anwendung der Methode in der pränatalen
Diagnostik der β -Thalassämie**

Karl Heinz Orend

1980

AUS DER KINDERPOLIKLINIK DER UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

DIREKTOR : PROF. DR. H. SPIESS

Die selektive Hämolyse von adulten Erythrozyten in
Mischungen mit fetalen Erythrozyten und die Anwendung
der Methode in der pränatalen Diagnostik der
 β - Thalassämie.

Inaugural - Dissertation zur Erlangung der
Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians - Universität zu
München

vorgelegt von

Karl Heinz Orend aus München

München 1980

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Michael Jensen
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Heinz Spiess
Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.1980



Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Jensen
für die freundliche Überlassung dieser Arbeit, für kritische
Anmerkungen, wertvolle Ratschläge und stilistische Bearbeitung.

Für die ausgezeichnete Zusammenarbeit danke ich
Frau H. Ritterfeld, die mir eine großartige Hilfe bedeutete.

Herrn Dr. G. Lipowsky und Herrn Dr. V. Zahn danke ich
für die freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548319_0074

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

1.1 Erwachsenenerythrozyten und fetale Erythrozyten

1.1.1 Hämoglobinmuster

1.1.2 Nachweis fetaler Erythrozyten bzw. von Hb - F

1.1.3 Isolierung von fetalen Erythrozyten

1.1.3.1 Agglutination der fetalen Erythrozyten mit anti - i Serum

1.1.3.2 Konzentration und Aktivität der Carbo- anhydrase in Erythrozyten

1.2 Pränatale Diagnostik

1.2.1 Ziel der Pränatalen Diagnostik

1.2.2 Pränatale Diagnostik aus Fetalblut

1.3 Fragestellung

2. Methoden

2.1 Selektive Hämolyse

2.1.1 Prinzip

2.1.2 Verfahren

2.2 Isoelektrische Fokussierung

2.3 Globinsynthese in vitro

2.3.1 Trennung von Globinen

2.3.2 Ermittlung der relativen Syntheserate

von α - β - γ -Globin

2.4 Messung der ^3H und ^{14}C Aktivität in doppelt markierten Proben

3. Ergebnisse

3.1 Hämolyserate von Erwachsenenerythrozyten und Neugeborenenerythrozyten

3.2 Hämolyserate von Erwachsenenerythrozyten und Neugeborenenerythrozyten in Mischungen beider Zellarten

3.3 Kontinuierliche Registrierung der Hämolyse von Erwachsenen- und Neugeborenenerythrozyten

3.4 Anwendung der selektiven Hämolyse unter den Bedingungen der pränatalen Diagnostik

4. Diskussion

4.1 Selektive Hämolyse in einer mit Erwachsenen-erythrozyten kontaminierten fetalen Blutprobe

4.1.1 Diskussion der Nachweismethoden

4.1.1.1 Betke- Kleinauer Färbung

4.1.1.2 Isoelektrische Fokussierung

4.1.1.3 Markierung der Erythrozyten mit ^3H und ^{14}C - Leucin

4.1.1.4 Kontinuierliche Registrierung der Hämolyse

4.1.2 Ausbeute an fetalen Erythrozyten

4.1.3 Selektive Hämolyse in der Praxis

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Erwachsenen - und fetale Erythrozyten

1.1.1 Hämoglobinmuster

95 % der Trockensubstanz eines Erythrozyten besteht aus Hämoglobin. Hämoglobine sind aus einem Protein- (Globin) und einem Porphyrinanteil zusammengesetzte Chromoproteine. Die Synthese des Proteinanteils wird beim Menschen durch mindestens vier Genpaare kontrolliert, die wiederum für die Bildung von vier verschiedenen Polypeptidketten vom Typ α , β , γ und δ verantwortlich sind.

Die α -Kette besteht aus 141, die β -Kette aus 146 Aminosäuren. Jedes Hämoglobinmolekül besteht aus vier Polypeptidketten, an denen die α -Kette in jedem Fall beteiligt ist. Jede Polypeptidkette besitzt als prosthetische Gruppe ein Hämmolekül. (37)

Die Proteinkomponente ist beim erwachsenen Menschen vorwiegend aus zwei α -Ketten und zwei β -Ketten (= Hb A₁) und zum geringen Teil aus zwei α - und zwei δ -Ketten (= Hb A₂) aufgebaut.

Von der 6. Schwangerschaftswoche bis zur Geburt ist Hämoglobin-F (Hb F) das überwiegende Hämoglobin des Feten. Es besteht aus je zwei α - und γ -Ketten.

γ -Globin hat wie β -Globin 146 Aminosäuren, es unterscheidet sich von β -Globin in 39 Positionen. (34)

Beim menschlichen Feten ist bereits in der 6. Schwangerschaftswoche Hb A₁ nachgewiesen worden, von dem bei der Geburt ein Anteil von 20 - 40 % vorhanden ist und während des Lebens kontinuierlich zunimmt (22). Im 5. Monat nach der Geburt beträgt der Hb-F Gehalt im Blut nur noch 10 % (40).

1.1.2 Nachweis fetaler Erythrozyten bzw. Hb-F

Der Nachweis von Hb-F wird in der Praxis häufig angewendet, wenn zum Beispiel bei Blutungen aus dem Magen-darmtrakt bei Neugeborenen festgestellt werden soll, ob es sich um verschlucktes mütterliches Blut handelt, oder wenn durch Untersuchung des mütterlichen Blutes ein feto-maternaler Blutübertritt bewiesen werden soll.

In Lösungen läßt sich Hb-F durch chromatographische und elektrophoretische Verfahren bestimmen. (siehe unter Methoden)

Fetale Erythrozyten werden mit der Säureelutionsmethode (20) nachgewiesen.

Während also der Nachweis von kindlichen Erythrozyten ohne große Schwierigkeiten durchgeführt werden kann, bereitet die Isolierung fetaler Zellen aus Proben, in denen sowohl fetale als auch Erwachsenenerythrozyten enthalten sind, Schwierigkeiten.

1.1.3 Isolierung von fetalen Erythrozyten

Das Interesse an einer Isolierung von fetalen Erythrozyten besteht in der pränatalen Diagnostik, wenn aus fetalen Zellen eine pränatale Diagnose gestellt werden soll. Während einer pränatalen Diagnostik sind häufig Blutproben zu untersuchen, in denen neben fetalen Erythrozyten auch Erwachsenenerythrozyten enthalten sind.

Unter den Eigenschaften, die in Erwachsenenerythrozyten und fetalen Erythrozyten verschieden sind, wurde für die Isolierung von fetalen Erythrozyten die Agglutination der fetalen Zellen mit Anti - i Serum und die unterschiedliche Konzentration und Aktivität des Enzyms Carboanhydrase benutzt.

1.1.3.1 Agglutination der fetalen Erythrozyten mit anti - i Serum

Die erste Methode, die zur Anreicherung fetaler Zellen benutzt wurde, beschrieben Kan und Mitarbeiter (23). Durch selektive Agglutination der fetalen Erythrozyten mit Anti - i Serum konnte eine Anreicherung der fetalen Zellen von 5 auf 75 % erzielt werden. Allerdings gingen dabei auch viele fetale Erythrozyten verloren; es war eine Ausbeute von 25 % erzielt worden. Gut agglutinierendes Anti - i Serum ist selten und die Ausarbeitung der Reaktionsbedingungen schwierig. Diese Gründe haben dazu geführt, daß sich diese Methode bisher nicht durchsetzen konnte.

1.1.3.2 Konzentration und Aktivität der Carboanhydrase in Erythrozyten

Ein Unterschied zwischen fetalen und Erwachsenen-erythrozyten besteht in der Konzentration und der Aktivität des Enzyms Carboanhydrase. Verschiedene Untersuchungen (10, 11, 30, 33) haben gezeigt, daß Erythrozyten zwei Isoenzyme der Carboanhydrase enthalten, die als Isoenzym B und C bezeichnet werden. Die Konzentration von Isoenzym B ist, verglichen mit der Konzentration von Isoenzym C, in den Erythrozyten 5 bis 10 fach höher, doch ist die spezifische Aktivität von Isoenzym C 5 bis 10 mal höher als die von Isoenzym B (11, 21, 33) .

Die zwei Isoenzyme der Carboanhydrase sind sowohl in Erwachsenenerythrozyten als auch in fetalen Zellen vorhanden. Jedoch ist die Aktivität und Konzentration der zwei Isoenzyme der Carboanhydrase in fetalen Erythrozyten wesentlich niedriger als in Erwachsenenerythrozyten. Die durchschnittliche Aktivität der beiden Isoenzyme beträgt in Erwachsenenerythrozyten 13,500 Enzymeinheiten/ml gepackte Erythrozyten, in fetalen Erythrozyten beträgt sie 1,220 Enzymeinheiten/ml (12, 36) . Die durchschnittliche Konzentration der beiden Isoenzyme der Carboanhydrase beträgt in Erwachsenenerythrozyten 6.72 mg/ml gepackte Erythrozyten, in fetalen Zellen 0,49 mg/ml (12, 36) .

Kürzlich haben Boyer et al (4) eine Methode veröffentlicht, nach der Erwachsenenerythrozyten in einer Mischung aus adulten Erythrozyten und fetalen Erythrozyten bestehenden Mischprobe selektiv hämolysiert werden können. Die Methode basiert auf den oben beschriebenen Konzentrations- und Aktivitätsunterschieden des in den Erwachsenenerythrozyten und fetalen Erythrozyten enthaltenen Enzyms Carboanhydrase und wird als Orskov-Reaktion bezeichnet. (31, 32)

Zusätzlich beschrieben Boyer et al einen weiteren Unterschied zwischen Erwachsenenerythrozyten und fetalen Erythrozyten, nämlich die unterschiedliche Permeabilität für den des Carboanhydrasehemmer Azetazolamid, der in fetale Erythrozyten zehnmal schneller eindringt als in die Erwachsenenerythrozyten. (4)

1.2. Pränatale Diagnostik

1.2.1 Ziel der Pränatalen Diagnostik

Eine große Anzahl erblicher Krankheiten führen zu einer starken geistigen und körperlichen Behinderung der betroffenen Patienten und sind keiner wirkungsvollen Therapie zugänglich. Eltern, denen bekannt ist, daß ihre Nachkommen dem erhöhten Risiko einer solchen Erkrankung ausgesetzt sind, verzichten häufig auf Kinder. Es ist das Ziel der pränatalen Diagnostik genetisch bedingter Erkrankungen, diesen Eltern zu einem Zeitpunkt der Schwangerschaft, da ein Abbruch noch möglich ist, mitzuteilen, ob ihr Kind krank sein wird oder nicht.

Betroffenen Familien wird so ermöglicht, ihrem Wunsche entsprechend gesunde Kinder zu bekommen.

1.2.2 Pränatale Diagnostik aus Fetalblut.

Während die Chromosomenanomalien und gewisse Stoffwechseldefekte durch die Untersuchung von Fruchtwasser und Amnionzellkulturen pränatal diagnostiziert werden können, lassen sich eine Reihe von Erbkrankheiten weder aus dem Fruchtwasser noch aus Amnionzellkulturen feststellen.

In neuerer Zeit wird versucht, die pränatale Diagnostik auf die schweren, häufig vorkommenden Anämieformen auszuweiten, nämlich die β -Thalassämie und Sichelzellanämie. Das zu dieser Untersuchung notwendige Fetalblut wird mit Hilfe eines Fetoskops aus einer Vene der Chorionplatte gewonnen (3, 17, 19).

Eines der Hauptprobleme besteht darin, daß häufig eine fetale Blutprobe gewonnen wird, die mit einem größeren oder kleineren Prozentsatz von mütterlichen Erythrozyten vermischt ist, so daß die pränatale Diagnostik fraglich oder unmöglich zu stellen ist (1, 14, 25, 25).

1.3. Fragestellung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine selektive Hämolyse der adulten Erythrozyten in einer mit Erwachsenenerythrozyten vermischten fetalen Blutprobe durchführbar ist, also eine Methode zur Isolierung fetaler Erythrozyten.

Es wurden zunächst Reaktionsbedingungen geprüft, unter denen eine möglichst weitgehende Zerstörung von Erwachsenenerythrozyten bei gleichzeitig hoher Ausbeute an fetalen Erythrozyten erreicht worden war.

Die Differenzierung der vor und nach Hämolyse vorhandenen Zellen wurde mit drei voneinander unabhängigen Methoden geführt, nämlich mit Hilfe der Säureelutionsmethode (20) ; mit Hilfe der Anteile an Hb.-A und Hb- F im Hämolysat (9) und durch radioaktive Markierung der beiden Zellarten mit jeweils einem anderen Isotop (^3H bzw. ^{14}C) vor ihrer Mischung und Zählung der ^3H und ^{14}C Aktivitäten in den noch intakten Zellen.

Die Methode der selektiven Hämolyse schien für die Anwendung in der pränatalen Diagnostik einer β -Thalassämie sehr erfolgversprechend. Vorher jedoch mußte untersucht werden, ob eine Präinkubation der Erythrozyten mit radioaktiven Aminosäuren eine anschließende Differentialhämolyse überhaupt noch zuließ.

Eine Präinkubation der Erythrozyten mit radioaktiven Aminosäuren ist notwendig, um durch Aktivitätsmessungen überprüfen zu können, ob der der β -Thalassämie zugrunde liegende genetische Defekt, nämlich eine reduzierte β -Globinsynthese, in einer zu untersuchenden fetalen Blutprobe vorhanden ist.

Schließlich wurde bei einer aus Norditalien stammenden Schwangeren, bei der aufgrund der Familienanamnese das Risiko auf homozygote β -Thalassämie ihres Feten

bestand, die Anwendbarkeit der selektiven Hämolyse unter den Bedingungen der pränatalen Diagnostik geprüft.

Die unter fetoskopischer Kontrolle durchgeführte Punktion der Chorionvene der Plazenta lieferte eine rein fetale Blutprobe. Da in diesem Fall die fetale Blutprobe nicht mit mütterlichen Erythrozyten vermischt war, wurden absichtlich eine definierte Anzahl mütterlicher Erythrozyten beigemischt. Es wurde also eine Mischblutprobe hergestellt, wie sie bei der Gewinnung von fetalem Blut durch Fetoskopie auftreten könnte.

2. Methoden

2.1. Selektive Hämolysse

2.1.1 Prinzip

In Lösungen, die NH_4^+ , Cl^- und HCO_3^- in bestimmten Konzentrationen enthalten, werden Erythrozyten hämolysiert (31, 32). Die Geschwindigkeit der durch NH_4^+ , Cl^- und HCO_3^- bedingten Hämolysse verlangsamt sich bei Anwesenheit von Carboanhydrasehemmern (18).

Der Mechanismus dieser Reaktion ist in Abb. 1) dargestellt (28).

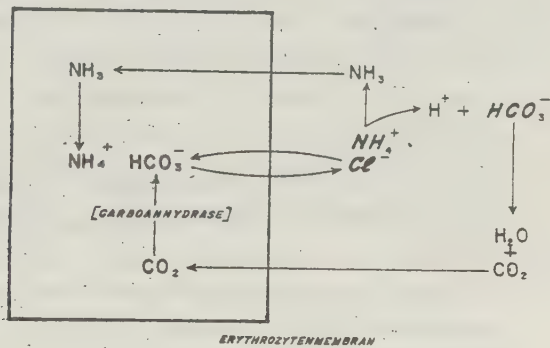


Abb. 1) Einstrom der in der Inkubationslösung enthaltenen Ionen in die Zelle und die intrazelluläre Bildung der osmotisch aktiven Ammoniumsalze.

Das aus NH_4^+ durch Abgabe von H^+ entstehende NH_3 diffundiert in die Zellen. Intrazellulär reagiert NH_3 mit Wasser wieder zu NH_4^+ . Die in der Inkubationslösung enthaltenen HCO_3^- Ionen und H^+ Ionen reagieren im Gleichgewicht zu H_2CO_3 , das zu CO_2 und H_2O dissoziiert. CO_2 kann in die Erythrozyten diffundieren und wird intrazellulär zu HCO_3^- umgewandelt. Diese Reaktion katalysiert das Enzym Carboanhydrase.

Durch die für Anionen durchlässige Erythrozytenmembran können die HCO_3^- Ionen gegen die in der Lösung enthaltenen Cl^- Ionen ausgetauscht werden. In der Zelle entstehen aus den neuen Ionen die Ammoniumsalze NH_4HCO_3 bzw. nach Austausch von HCO_3^- gegen Cl^- , NH_4Cl .

Diese osmotisch aktiven Salze bewirken infolge Wassereinstrom in die Zellen die Hämolyse der Erythrozyten. Der geschwindigkeitsbestimmende Faktor der genannten Reaktionen und damit der Hämolyse der Erythrozyten ist die Umwandlung von CO_2 zu HCO_3^- in der Zelle (18, 28).

Die Carboanhydrase in den Erythrozyten, die diese Reaktion katalysiert, übt somit eine entscheidende Funktion, nämlich die Bildung von HCO_3^- bei der Hämolyse der Erythrozyten aus.

Die Aktivität der Carboanhydrase ist in Erwachsenenerythrozyten wesentlich höher als in fetalen und Neugeborenenerythrozyten (12, 36). Deswegen erfolgt die durch NH_4^+ , Cl^- , HCO_3^- hervorgerufene Hämolyse in

fetalen Zellen und Neugeborenenerythrozyten langsamer als in Erwachsenenerythrozyten. Der Unterschied wird noch vergrößert, wenn dem Inkubationsmedium der Carboanhydrasehemmer Acetazolamid zugesetzt wird, weil Acetazolamid in fetale Erythrozyten zehnmal schneller eindringt als in Erwachsenenerythrozyten (4).

2.1.2 Verfahren

Die Erythrozyten wurden mittels Venenpunktion von Erwachsenen und Frühgeborenen gewonnen. Die Zellen wurden fünfmal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die gewaschenen Erythrozyten wurden in einem definierten Volumen mit 0,15 n NaCl aufgeschwemmt und die Anzahl der Erythrozyten pro Milliliter gezählt. Angestrebt wurde eine Menge zwischen 0,5 ml und 1 ml gepackte Erythrozyten.

Das Inkubationsmedium der Erythrozyten enthielt 0,1844 M NH_4Cl , 3mM NH_4HCO_3 und 91 μM Acetazolamid/l. Das Acetazolamid wurde nicht wie NH_4Cl und NH_4HCO_3 in Aqua dest., sondern in einer 0,15 n NaOH gelöst und die Lösung anschließend mit HCl auf pH 6,8 titriert. Das Inkubationsmedium enthielt auf ein Volumen gepackter Erythrozyten 18 Volumen NH_4Cl -Lösung und 2 Volumen Acetazolamidlösung. Dieser Ansatz wurde geschüttelt, und nach zwei Minuten wurden 2 Volumen NH_4HCO_3 -Lösung zugegeben. Nach bestimmten Zeiten wurden aus dem Ansatz Proben entnommen, deren Volumen sich nach der vorhandenen Ansatzmenge und

der Zahl der gewünschten Probeentnahmen richtete. Die günstigsten Zeitpunkte der Probeentnahmen wurden durch Versuchswiederholungen ermittelt.

Die Proben wurden 1,5 Minuten bei 12 000 rpm zentrifugiert ¹. Der Überstand wurde abpipettiert; er enthielt das Hämoglobin der Zellen, die bereits hämolysiert waren.

Mit der Hämoglobincyanidmethode (29) wurde die Hämoglobinkonzentration der verschiedenen Proben photometrisch bei 540 nm gemessen. Ebenfalls wurde die Ausgangshämoglobinkonzentration einer Probe gemessen.

Zu diesem Zweck wurde bei Ansatzbeginn eine Probe entnommen und durch Einfrieren und Auftauen alle Erythrozyten hämolysiert.

Mit Hilfe der Gesamthämoglobinkonzentration einer Probe und dem Hämoglobin der hämolysierten Zellen einer Probe wurde sowohl die Menge der übriggebliebenen als auch der hämolysierten Erythrozyten berechnet.

Die nicht hämolysierten Zellen wurden nur untersucht, wenn Versuche mit Mischungen aus Erwachsenenerythrozyten und Neugeborenenerythrozyten durchgeführt wurden. In diesen Versuchsreihen wurden die zu verschiedenen Inkubationszeiten übriggebliebenen Erythrozyten nach der Anzahl und der Art differenziert.

1) Mod. 3200 Zentrifuge, Netheler und Hinz, Hamburg

Die Gesamtzahl der Zellen wurde ermittelt; die Unterscheidung nach Erwachsenen- bzw. Neugeborenenerythrozyten wurde mit drei voneinander unabhängigen Methoden vorgenommen, nämlich

- 1) mit der spezifischen Anfärbung der Erwachsenen- und fetalen Erythrozyten nach Betke und Kleihauer (20)
- 2) mit Hilfe der Bestimmung der relativen Anteile an Hb - A und Hb - F (siehe unter Methoden 2.1.2.1)
- 3) durch radioaktive Markierung der beiden Zellarten mit jeweils einem anderen Isotop (^3H und ^{14}C) vor ihrer Mischung und Zählung der ^3H und ^{14}C Aktivitäten in den noch intakten Zellen.
(siehe unter Methoden 2.1.2.2 und 2.1.2.3)

2.2. Isoclektrische Fokussierung

Es wurden die relativen Anteile an Hb F und Hb A als Maß für den Prozentsatz fetaler bzw. Erwachsenenerythrozyten in einer Probe mit der isoelektrischen Fokussierung nach Drysdale et al (9) in einem pH-Bereich von 6,0 bis 8,0 gemessen. Die anschließend durchgeführte Densitometrie¹ der Gele ermöglichte die Quantifizierung der relativen Anteile von Hb F und Hb A durch Integration der den beiden Banden zugehörigen Peaks.

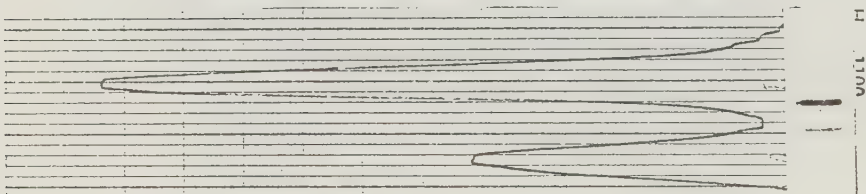


Abb. 2) Auftrennung der Hämoglobine einer Mischung aus Erwachsenenerythrozyten und fetalen Erythrozyten in der isoelektrischen Fokussierung. pH 8 (oben) bis pH 6 (unten) Ampholyt. Obere Bande = Hb F (75 %), untere Bande = Hb A (25 %).

Densitometrie bei 540 nm.

Unter Berücksichtigung des primär in Fetalblut enthaltenen Hb A-Anteil ließen sich daraus die Anteile an fetalen und Erwachsenenerythrozyten berechnen.

- 1 Mod. 240 mit Mod. 2520, Gilford
Instrument Laboratories Inc., Oberlin,
Ohio, USA

2.3 Globinsynthese in vitro (1)

Die Retikulozyten und kernhaltigen Erythrozytenvorstufen synthetisieren für einige Zeit nach der Entnahme in vitro noch Globin. Ist im Inkubationsmedium radioaktives Leucin¹ vorhanden, so wird es in das Globin eingebaut. Leucin wird deswegen verwendet, weil es in allen Globinketten nahezu gleich oft vorkommt, je achtzehnmal in α - und β -Globin, siebzehnmal in γ -Globin.

Die Markierung der Erythrozyten erfolgte unmittelbar nach Abnahme der Probe, da die in vitro Proteinsynthese der Zellen schnell abnimmt.

Die Erythrozyten wurden zunächst mit KRP² gewaschen. Die Erythrozyten wurden jetzt mit KRP auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und nach Zählung eines Tropfens in der Zählkammer die Gesamtzahl der Erythrozytenprobe

- 1 L- Leucin - ³H, NET 135 H, New England
Nuclear Corp., Boston, Mass. USA

2 Krebs- Ringer- Phosphat- Puffer (KRP)

0,9 % NaCl 100 Teile

1,15 % KCl 4 Teile

0,61 % $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 3 Teile

3,82 % $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 1 Teil

1,42 % Na_2HPO_4 20 Teile;

pH 7,4 285 mOsm

berechnet. Mit zwei zusätzlichen Waschvorgängen wurde das im Serum enthaltene Leucin weitgehend entfernt, das die spezifische Aktivität des später zugesetzten radioaktiven Leucins verdünnen würde. Nachdem der Überstand abgesaugt worden war, wurden die Zellen in der Inkubationslösung¹ aufgeschwemmt. Die Lösung enthielt 50 uCi radioaktives Leucin. Die Ansätze wurden bei 37⁰ C inkubiert. Nach zwei Stunden wurde die Inkubation durch viermaliges Waschen der Erythrozyten in kalter physiologischer Kochsalzlösung unterbrochen. Die Erwachsenenerythrozyten wurden mit Leucin ³H, die fetalen Erythrozyten mit Leucin ¹⁴C inkubiert.

1 Inkubationslösung (für 0,5 bis 1 ml gepackte Erythrozyten):

Aminosäurelösung (19 AS, kein Leu, jede 0,005 M)

	0,04 ml
KRP	1 ml
Dialysiertes AB-Plasma	1 ml
Glucose	4 ml
Leucin ³ H bzw. Leucin ¹⁴ C	0,05 ml

2.3.1 Trennung von Globinen

Die zu untersuchenden Erythrozyten wurden durch Zusatz des fünffachen Volumens von 0,005 M MgCl_2 -Lösung hämolysiert.

Nach der Methode von Clegg et al. (5) wurde aus Hämoglobin Globin hergestellt: Hämoglobin wurde durch Eintropfen in 2 % HCl in Aceton von -20°C präzipitiert. Das Häm- freie Präzipitat wurde dreimal in kaltem Aceton gewaschen, unter Stickstoff getrocknet. Die Trennung in α -, β - und γ -Ketten erfolgte in der bei Clegg beschriebenen Weise durch Chromatographie an Carboxymethylzellulose in 8 M Harnstoff bei pH 6,7 durch einen linearen Gradienten von Na_2HPO_4 . Alle Puffer enthielten 1 mMol/l Dithiothreitol. Die 8 M Harnstofflösung wurde vorher durch Passage durch ein Mixed bed resin¹ frisch deionisiert, und hatte eine Leitfähigkeit von weniger als $5 \times 10^{-6} \text{S}$. Die in den einzelnen Globinfraktionen enthaltene Radioaktivität wurde nach Einbringen eines ml jeder Fraktion in 15 ml Szintillator² im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

1 AG 501 - x ' (D), Bio Rad Laboratories,
Richmond, Calif, USA

2	PPO (Diphenyl - Oxazol)	12,6 g
	POPOP (2.2. -p-Phenylene-bis- 5- phenyloxazol)	0,9 g
	Toluol	1200 ml
	Methanol	1200 ml
	Äthylenglycolmonomethyläther	200 ml

2.3.2 Ermittlung der relativen Syntheserate von α -, β -, γ -Globin

Zunächst wurde die Gesamtradioaktivität, die in die einzelnen Globinketten inkorporiert wurde, durch Integration der Peaks berechnet. Diese Summen wurden dann zueinander ins Verhältnis gesetzt. Als Parameter für die Diagnose bzw. den Ausschluß der β -Thalassämie bei Feten wurde das $\beta/\beta + \gamma$ Syntheseverhältnis gewählt, das heißt der Anteil, den die β -Globinsynthese an der gesamten nicht α -Globinsynthese einnimmt (7).

2.4 Messung der ^3H und ^{14}C Aktivität

Für diese Messungen wurden in die Szintillationsröhrchen zu 0,4 ml der nicht hämolysierten Zellen einer jeden Probe 1,5 ml einer 1:1 Mischung Isopropylalkohol und Protosol^R zugegeben. Um das darin befindliche Hämoglobin zu bleichen, wurde in jedes Röhrchen 1 ml einer 30% H_2O_2 gegeben; 30 Minuten später wurden 10 ml Aquasol^R zugefügt. Die Herstellung der Meßproben erfolgte unter ständiger Kühlung.

Zur Messung¹ wurde die Fensterung und die Verstärkung der einzelnen Kanäle jeweils so gewählt, daß entweder nur ^{14}C bzw. ^3H Impulse gemessen werden konnten. Folgende Kanaleinstellung wurde benutzt:

Kanal 1	Fenster A = 0 Fenster B = ∞	Verstärkung = 1
Kanal 2	Fenster A = 0,7 Fenster B = 1,2	Verstärkung = 1
Kanal 3	Fenster A = 0 Fenster B = 0,07	Verstärkung = 0

Durch die vorangegangenen Untersuchungen mit Meßröhrchen, die Proben von bekannter Radioaktivität enthielten, wurden für die einzelnen Kanäle folgende Meßeigenschaften gefunden:

In Kanal 1 wurde die Gesamtradioaktivität einer Probe, also ^3H und ^{14}C gemessen. In Kanal 2 wurden 28,8 % der ^{14}C -Aktivität erfaßt, aber keine ^3H -Impulse gemessen. Im Kanal 3 wurden 41 % der ^3H -Impulse und keine ^{14}C -Impulse gemessen.

3. Ergebnisse

3.1 Hämolyserate von Erwachsenen- und Neugeborenen-erythrozyten

Es wurde die Hämolyserate von Erwachsenenerythrozyten und Neugeborenenerythrozyten während der Inkubation in einer $\text{NH}_4\text{Cl} - \text{HCO}_3^-$ Lösung bestimmt.

Anschließend wurde der Einfluß des Carboanhydrasehemmers Acetazolamid auf die Hämolyserate der Erythrozyten geprüft. Die Abbildungen 2 - 5 zeigen die Ergebnisse von Beispielen dieser Versuchsreihen.

Die Ergebnisse zeigten, daß Erwachsenen- und Neugeborenenerythrozyten im Inkubationsmedium mit unterschiedlicher Geschwindigkeit hämolysierten. Die Erwachsenenerythrozyten waren nach 20 Minuten Inkubationsdauer zu 98 %, als nahezu vollständig hämolysiert, während die Neugeborenenzellen zur vollständigen Hämolyse 70 Minuten benötigten.

Die unterschiedliche Geschwindigkeit der Hämolyserate der Zellen ließ sich durch Zusatz von Azetazolamid ins Inkubationsmedium noch verstärken.

Die Erwachsenenerythrozyten hämolysierten bei Zusatz von 91 μM Azetazolamid in die Lösung nach 30 Minuten nahezu vollständig, also mit einer 10 minütigen Verzögerung gegenüber der Versuchsreihe ohne Zusatz von Azetazolamid.

Bei den Neugeborenenerythrozyten konnte nach Zugabe von Azetazolamid ins Inkubationsmedium keine vollständige Hämolyse der Zellen erreicht werden. Es bleiben auch nach 2 Std. Inkubation noch 10-15 % der Zellen unversehrt.

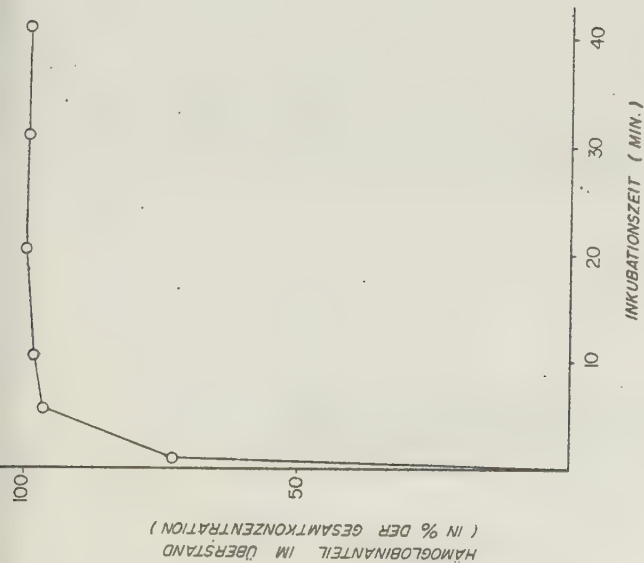


Abb. 2) Hämolyse von Erwachsenen-erythrozyten. Inkubationsmedium mit 0,1844 M NH_4Cl und 3 mM NH_4HCO_3 /l.

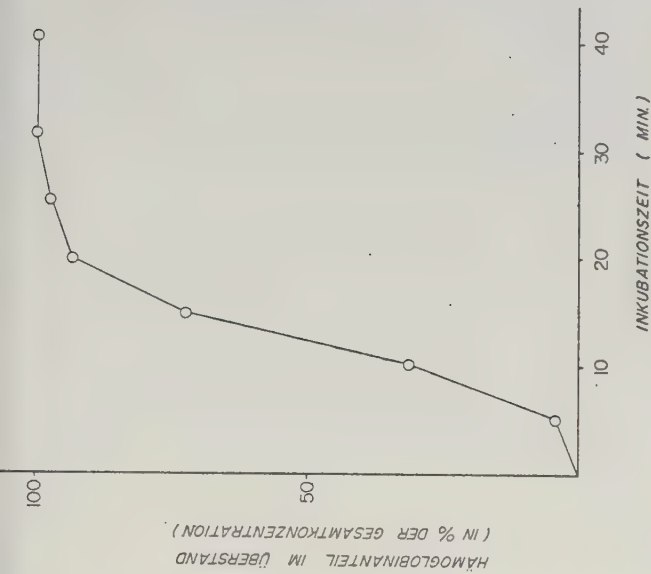


Abb. 3) Hämolyse von Erwachsenen-erythrozyten. Inkubationsmedium wie in Abb. 2) und zusätzlich 91 $\mu\text{M}/1$ Azetazolamid.

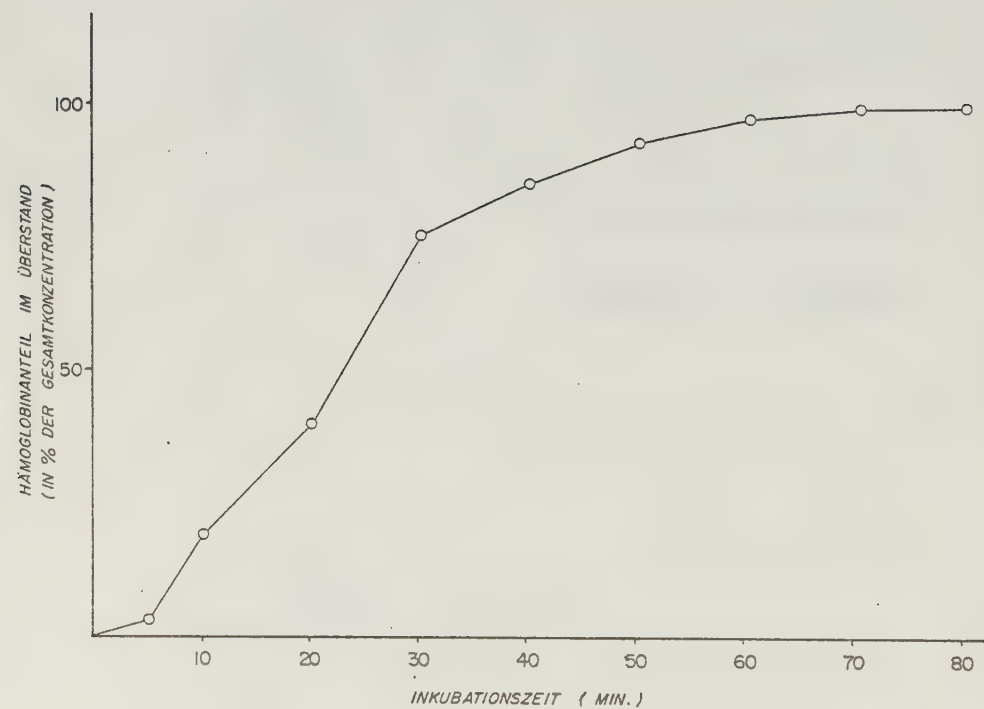


Abb. 4) Hämolyse von Frühgeborenenerythrozyten.
Inkubationsmedium siehe Legende Abb. 2

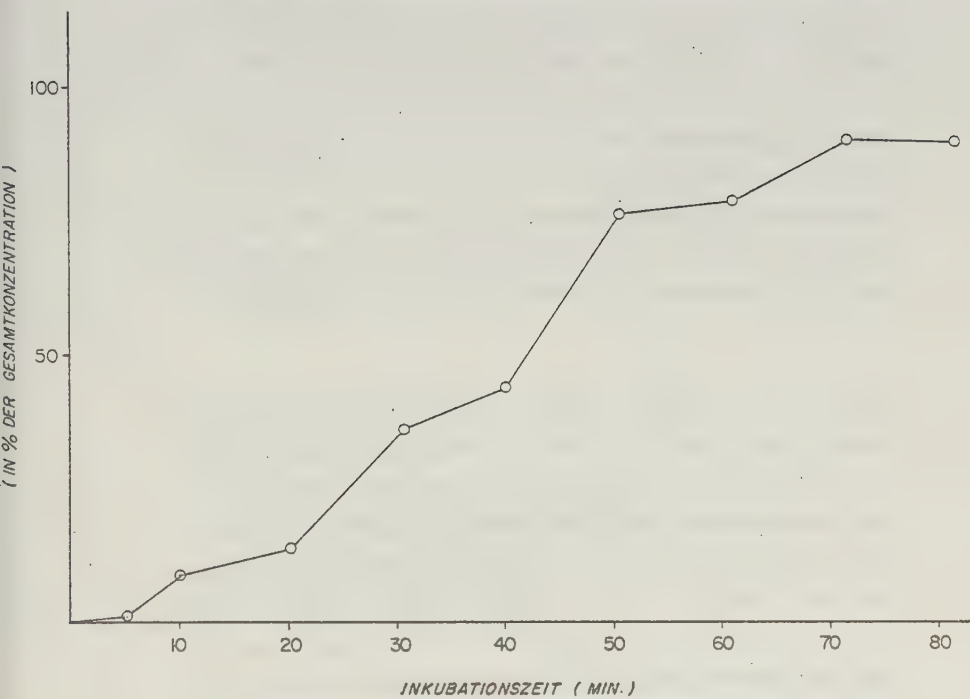


Abb. 5) Hämolyse von Frühgeborenenerythrozyten.

Inkubationsmedium siehe unter Legende Abb. 3).

3.2. Hämolyserate von Erwachsenen- und Neugeborenenerythrozyten in Mischungen beider Zellarten

In den Abbildungen 6 - 8 sind die Ergebnisse von Beispielen aus drei Versuchsreihen zusammengefaßt, in denen Mischungen von Erwachsenen- und Neugeborenenerythrozyten im $\text{NH}_4\text{Cl} - \text{HCO}_3^-$ Medium unter Zusatz von Azetazolamid inkubiert wurden. Die zu verschiedenen Zeiten der Inkubation noch nicht hämolysierten Zellen wurden in den drei Versuchsreihen mit drei voneinander unabhängigen Methoden differenziert. (siehe unter Methoden)

Die Ergebnisse zeigten, daß die bei getrennter Inkubation festgestellten unterschiedlichen Hämolysraten der Erythrozyten auch für Inkubationen von Mischungen beider Zellarten zutreffen.

Nach 40 Minuten Inkubationsdauer waren in den gezeigten Versuchen zwischen 94 % und 98 % der Erwachsenenerythrozyten hämolysiert, während nach derselben Zeit noch 60 % bis 92 % der Neugeborenenerythrozyten unversehrt geblieben sind.

Der günstigste Zeitpunkt für eine Differentialhämolyse, bei dem die Ausbeute an fetalen Zellen noch mehr als die Hälfte der Anfangsmenge beträgt, ist demnach zwischen 30 und 40 Minuten Inkubationsdauer. Das Ausgangsverhältnis von Erwachsenenerythrozyten zu Neugeborenenzellen vor ihrer Inkubation zur Hämolyse betrug in den drei Versuchsreihen jeweils 3:1, 4:1 und 5:1. Dieses Verhältnis von Erwachsenenerythrozyten zu Neugeborenenerythrozyten änderte sich nach 40 Minuten Inkubationsdauer zugunsten der Neugeborenenerythrozyten in 1:8, 1:8 und 1:6.

In diesen Versuchsreihen wurden während einer 40 minütigen Inkubation von Mischblutproben die Anreicherungs-faktoren 24, 32, 30 erzielt.

Unter dem Anreicherungs-faktor versteht man die Zahl, die das Verhältnis von Erwachsenenerythrozyten zu Neugeborenenerys am Anfang der Inkubation, dividiert durch dasselbe Verhältnis nach den beschriebenen Inkubationszeiten angibt.

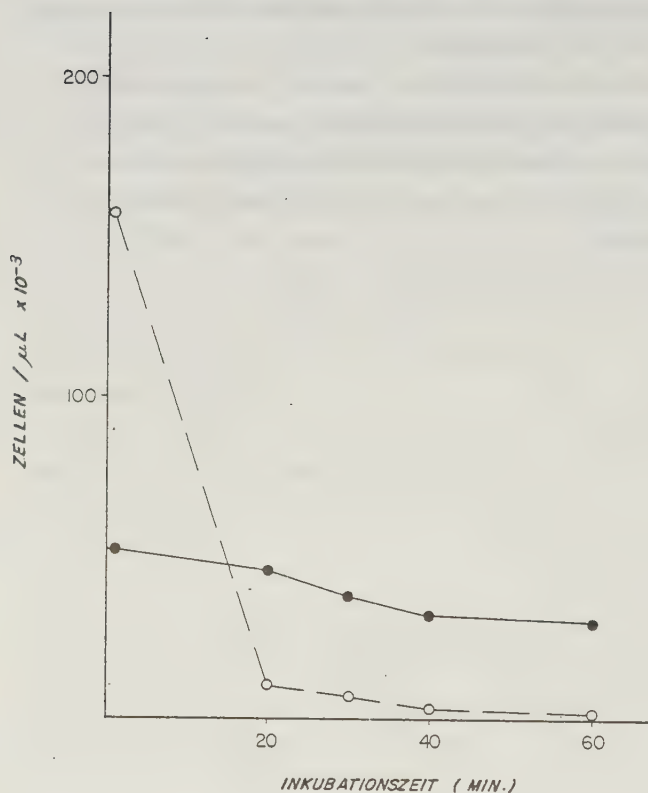


Abb. 6) Selektive Hämolyse in einer Mischung von 75 %
 Erwachsenenerythrozyten und 25 % fetalen Erythro-
 zyten. Die bei den einzelnen Probenentnahmen noch
 nicht hämolysierten Zellen wurden mit Hilfe der
 Betke - Kleihauer Färbung (2) quantifiziert.
 Inkubationsmedium entsprechend Legende Abb. 3)
 ○---○ : Erwachsenenerythrozyten;
 ●—● : fetale Erythrozyten.

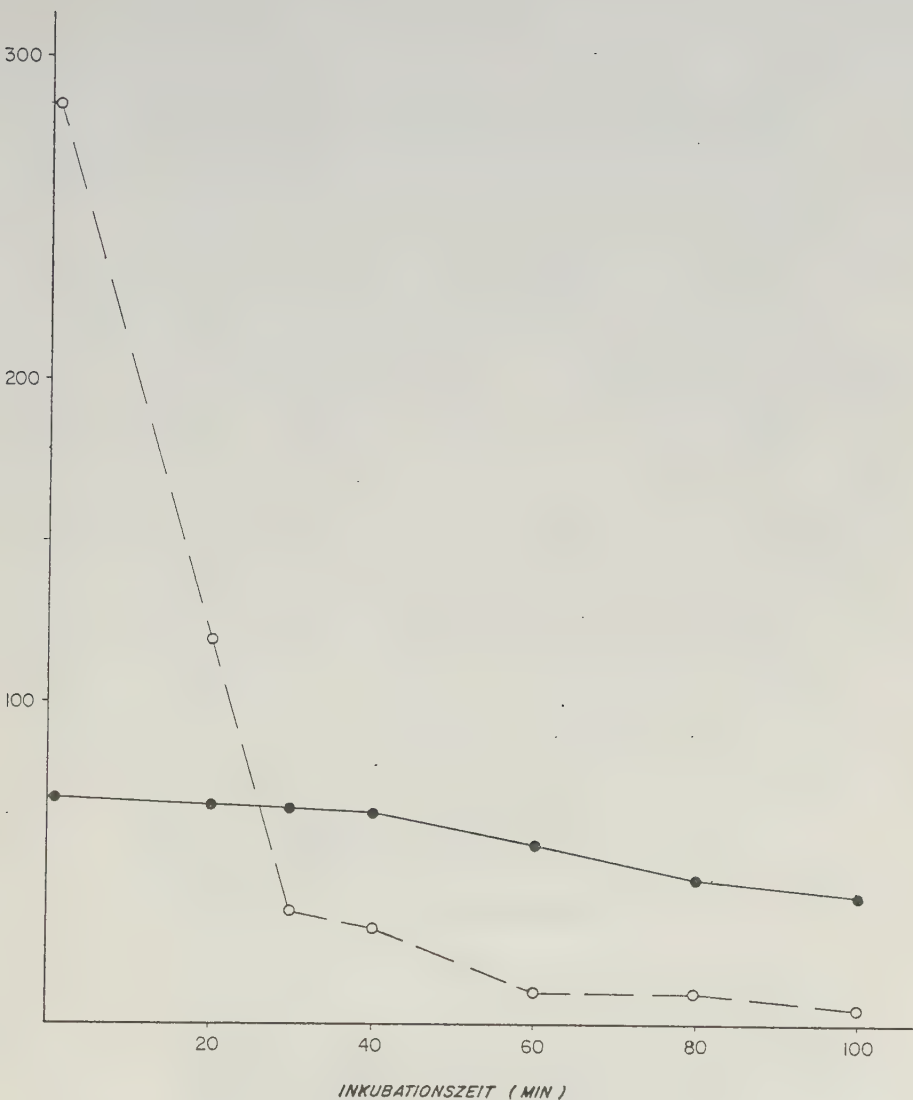


Abb. 8) Selektive Hämolyse in einer Mischung von 80 % Erwachsenenerythrozyten und 20 % fetalen Erythrozyten. Die Unterscheidung der jeweils noch intakten Erythrozyten wurde durch Aktivitätsmessung vorgenommen, nachdem die Erythrozyten vor der Inkubation mit Leuzin ^3H (Erwachsenenerythrozyten) bzw. Leuzin ^{14}C (fetale Zellen) markiert wurden. Inkubationsmedium entsprechend Legende Abb. 3. o---o: Erwachs. Zellen; ●—●: fetale Zellen.

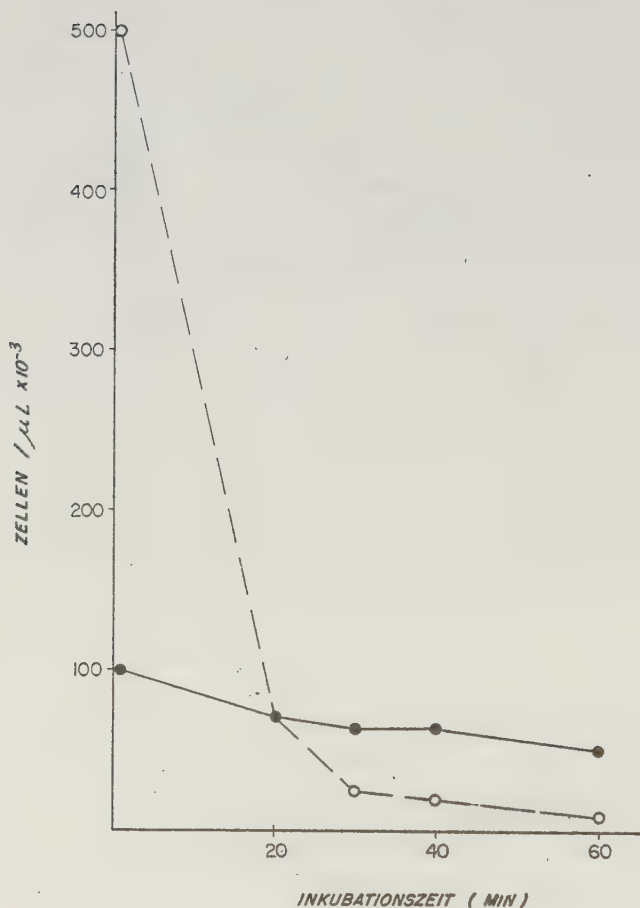


Abb. 7) Selektive Hämolyse bei einer Mischung von Erwachsenenerythrozyten und fetalen Erythrozyten im Verhältnis 85:15. Die unversehrten Zellen wurden mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung differenziert. Inkubationsmedium entsprechend Legende Abb. 3.

○---○: Erwachsenenerythrozyten;
 ●—●: fetale Erythrozyten.

3.3 Kontinuierliche Registrierung der Hämolyse von Erwachsenenerythrozyten und fetalen Zellen

Die beste Inkubationszeit für eine Differentialhämolyse, bei der die Ausbeute an fetalen Zellen noch mehr als die Hälfte der Anfangsmenge beträgt, variierte in allen durchgeführten Experimenten zwischen 30 und 40 Minuten. Für analytische Zwecke kann die Inkubationsdauer einer selektiven Hämolyse mit einer Methode bestimmt werden, bei der die Hämolyse der Zellen direkt verfolgt und registriert wird. Entsprechend kann die Hämolyse dann beendet werden, wenn die in der Mischblutprobe enthaltenen Erwachsenenerythrozyten zerstört sind. Die Methode basiert auf der Tatsache, daß sich während der Inkubation der Hämatokrit der zu untersuchenden Blutprobe ändert, da die Erwachsenenerythrozyten hämolysieren.

Das Hämolysat wird dadurch für Licht durchlässiger, d. h. die Trübung der Inkubationslösung nimmt ab. Die selektive Hämolyse wird somit über die Hämatokritänderung mit einem Photometer bei 545 nm indirekt beobachtet.

Die mit Hilfe des Photometers gemessene Extinktion wird kontinuierlich registriert.

Diese Methode ist für präparative Zwecke nicht geeignet, da der Hämatokrit der zur selektiven Hämolyse anstehenden Blutprobe mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1,5 Vol % gesenkt werden muß, damit mit dem Photometer die Änderung der Trübung gemessen werden kann. Man erhält dadurch bei der Verwendung von 0,5 - 1 ml gepackter Ery-

throzyten so große Volumina , daß sie das Fassungsvermögen der Photometerküvetten überschreiten.

In den Abbildungen 9, 10, 11 sind Beispiele dargestellt, in denen die Hämolyse von Erwachsenenerythrozyten, fetalen Erythrozyten , und von Mischungen beider Zellarten durch die kontinuierliche Registrierung der Extinktion verfolgt wurde.

Gleichzeitig wurde hier ein anderes Inkubationsmedium verwendet. Es wurde das Inkubationsmedium wie unter 2.1.2 beschrieben benutzt, nur wurde die zehnfache Menge der NH_4HCO_3 - Lösung auf ein Volumen gepackte Erythrozyten zugegeben. Dadurch ließ sich die selektive Hämolyse von Erwachsenenerythrozyten beschleunigen, wie in den Abbildungen 9, 10, 11 zu sehen ist.

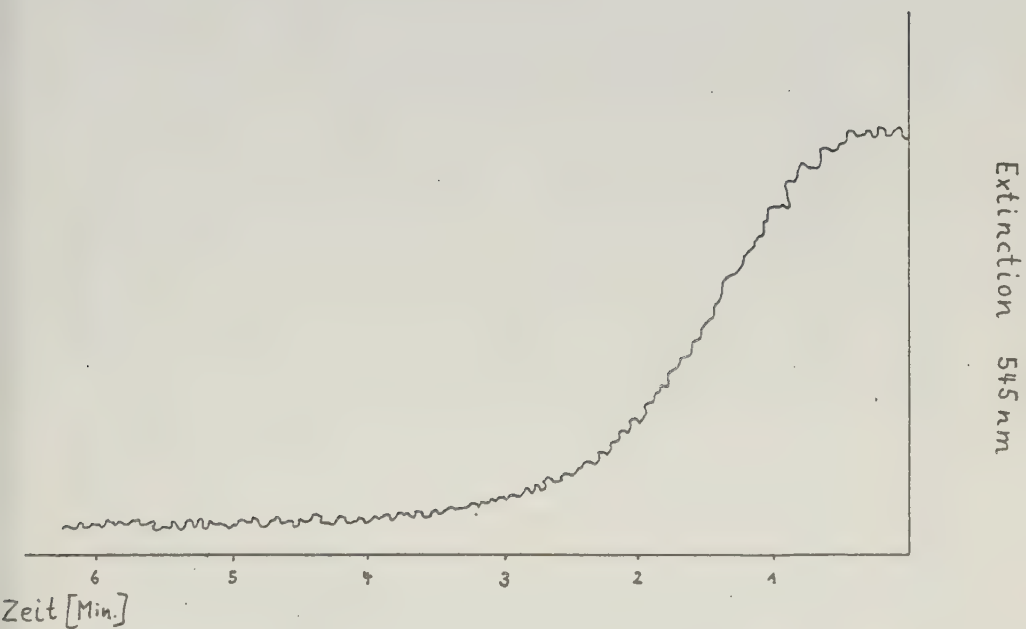


Abb. 9) Hämolyse von Erwachsenenerythrozyten;

Ansatz 100 μ l, HK 1,5 Vol%

Inkubationsmedium mit 1 ml 10^{-3} M Acetazolamid-

lösung , 90 ml 0,1844 M NH_4Cl , 48 ml 3 mM NH_4HCO_3

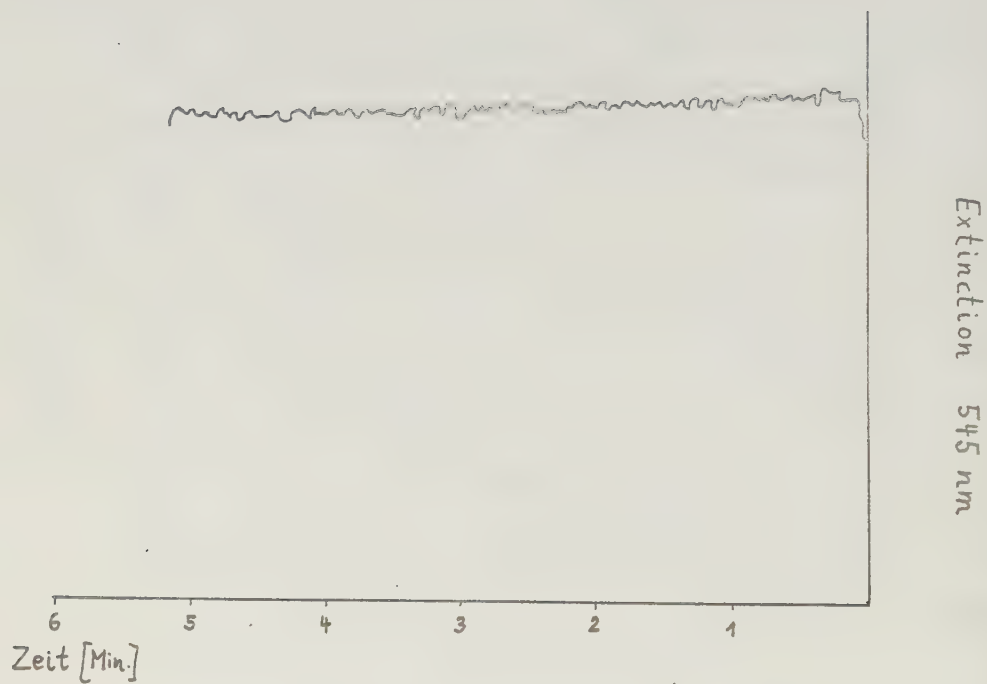


Abb. 10) Hämolysen von fetalen Erythrozyten;

Ansatz $100\mu\text{l}$, Hk 1,5 Vol%

Inkubationsmedium siehe Legende Abb. 9

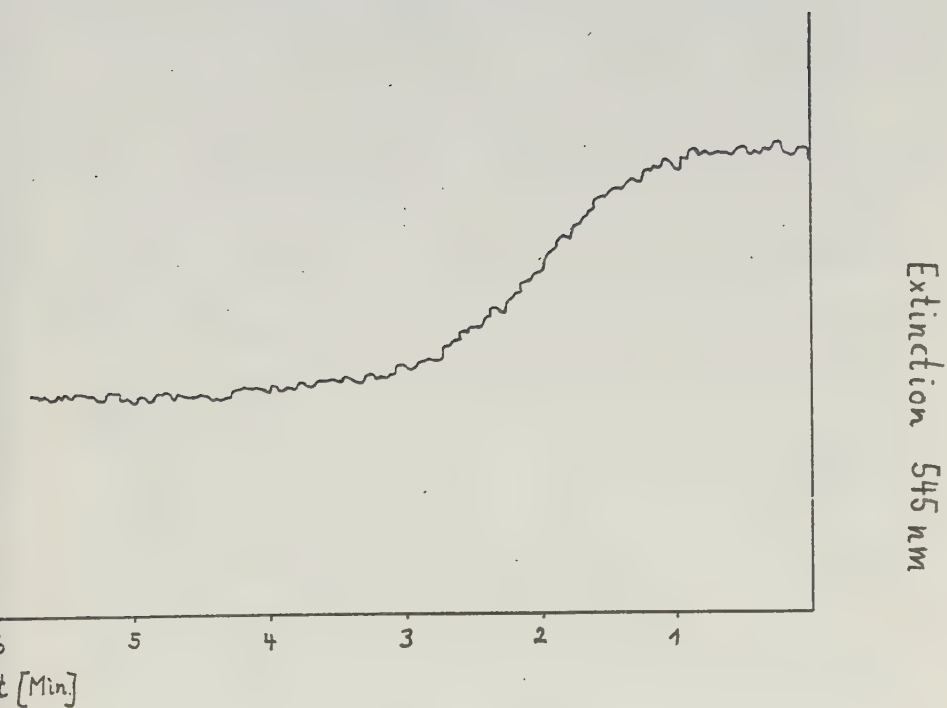


Abb. 11) Hämolyse einer Mischung aus Erwachsenenerythrozyten
 und fetalen Erythrozyten im Verhältnis 1:1;
 Ansatz $100\mu\text{l}$, HK 1,5 Vol%
 Inkubationsmedium siehe Legende Abb. 9

3.4. Anwendung der selektiven Hämolyse unter den Bedingungen der pränatalen Diagnostik

Die Ergebnisse der unter 3.2. beschriebenen Versuchsreihen zeigten, daß mit der beschriebenen Methode sich die Erwachsenenerythrozyten in einer mit fetalen Zellen vermischten Blutprobe selektiv hämolysieren lassen.

Bei einer aus Norditalien stammenden Schwangeren bestand aufgrund der Familienanamnese das Risiko auf homozygote β -Thalassämie ihres Feten. Bei beiden Elternteilen war bekannt, daß sie heterozygote Träger des für die β -Thalassämie verantwortlichen Gens sind.

Die β -Thalassämie ist eine autosomal dominant vererbte schwere Anämieform, die vom Säuglingsalter an die kranken Kinder und ihre Familien belastet, altersentsprechende Aktivität und kontinuierliche Ausbildung nicht zuläßt, und die Lebensdauer erheblich verkürzt (27). Der genetische Defekt der β -Thalassämie drückt sich in einer reduzierten β -Globinsynthese aus (16, 35, 38, 39). Die eingeschränkte β -Globinsynthese bei β -Thalassämie führt zu verminderten Gehalt der Erythrozyten an Hämoglobin und zu einem Überschuß an α -Globin (6, 41). Freie α -Ketten sind relativ schwer löslich und präzipitieren in der Zelle (15, 42). Diese α -Präzipitate sind für die kurze Lebensdauer der Zelle verantwortlich (2, 8, 13). Die Anämie der Thalassämie hat also eine zweifache Pathogenese: eine ineffektive Erythropoese und einen erhöhten Zellabbau.

Die unter fetoskopischer Kontrolle durchgeführte Punktion der Chorionvene der Plazenta lieferte eine Blutprobe, die nur aus fetalen Erythrozyten bestand.

Sehr oft passiert es aber, daß bei der Gewinnung von fetalem Blut die Blutprobe mehr oder weniger mit einer großen Anzahl mütterlicher Erythrozyten vermischt ist (1, 26). Die bei der Patientin gewonnene Blutprobe enthielt 220×10^6 fetale Zellen. In diesem Fall war die fetale Blutprobe nicht mit mütterlichen Erythrozyten vermischt. Es wurden zu 70×10^6 Erythrozyten der Probe 1050×10^6 mütterliche Erythrozyten beigemischt. Die Mischung enthielt also nur noch 6,25 % fetale Erythrozyten. Es wurde also absichtlich eine Mischblutprobe hergestellt, wie sie bei der Gewinnung von fetalem Blut durch Fetoskopie auftreten könnte. Die künstlich hergestellte Mischprobe wie auch die restliche rein fetale Probe, die hoch 150×10^6 fetale Erythrozyten enthielt, und als Kontrolle eine nur aus mütterlichen Erythrozyten bestehende Probe wurden mit H^3 - Leuzin zur in vitro Globinsynthese inkubiert. (siehe Methoden)

Die Hälfte der mit mütterlichen Erythrozyten vermischten fetalen Probe wurde nach Abschluß der in vitro Globinsynthese zur selektiven Hämolyse inkubiert, bei der anderen Hälfte wurde dieser Schritt unterlassen. Die Inkubationszeit betrug 40 Minuten.

Anschließend wurden Globinradiochromatogramme von der Mischprobe einmal mit und einmal ohne durchgeführte selektive Hämolyse, sowie von der rein fetalen Probe angefertigt. Diese Globinradiochromatogramme sind in den Abbildungen 12, 13, 14 dargestellt.

In Abb. 12, also dem Globinradiochromatogramm der künstlich hergestellten Mischung ohne Anwendung der selektiven Hämolyse betrug die β - Globinsynthese an der gesamten nicht α - Globinsynthese 6,7 % . Dies war ein Wert, der für einen gesunden, höchstens heterozygoten Feten sprach (24, 27) .

Nach selektiver Hämolyse der künstlich hergestellten Mischprobe zeigte das Globinradiochromatogramm, das in Abb. 13 dargestellt ist, überhaupt keinen β - Peak. Diese Tatsache bewies, daß allein die mütterlichen Erythrozyten für den in Abb. 12 vorhandenen β - Peak verantwortlich waren, da nur sie β - Globin synthetisiert hatten.

Das Ergebnis wurde durch das Globinradiochromatogramm der rein fetalen Probe in Abb. 14 bestätigt, das ebenfalls keine β - Globinradioaktivität aufwies.

Aufgrund dieser Feststellungen galt als sicher, daß bei dem Feten eine homozygote β - Thalassämie vorlag (24) , da seine erythroiden Zellen kein β - Globin bilden konnten.

Die Mutter ließ daraufhin ihre Schwangerschaft unterbrechen.

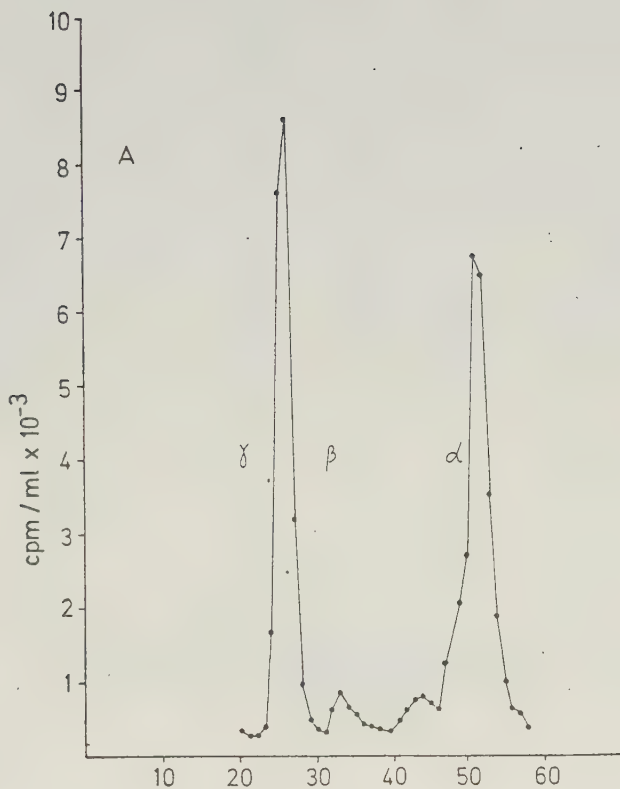


Abb. 12: Globinradiochromatogramm einer Mischung mit 93,75 % mütterlichen Erythrozyten und 6,25 % fötalen Zellen bei fetalem β -Thalassämierisiko. $\beta/\beta + \gamma$ Syntheseverhältnis = 0,067.

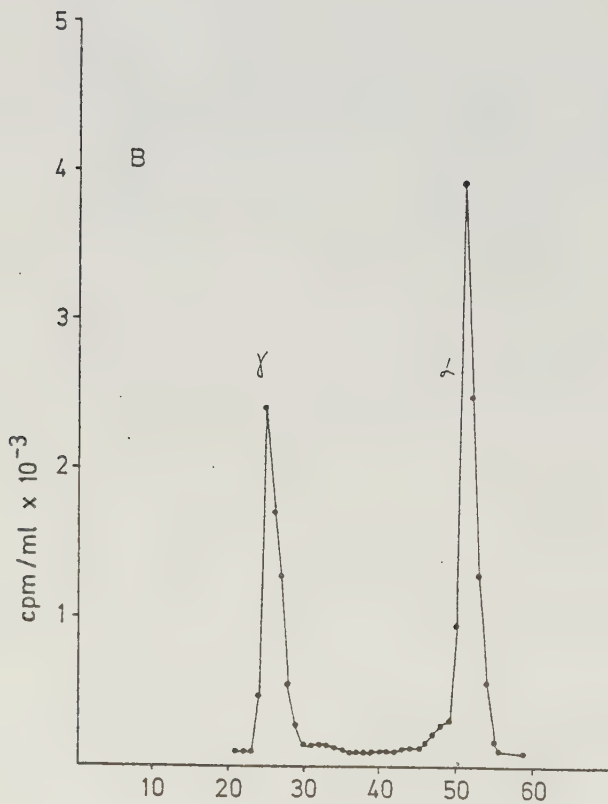


Abb. 13: Globinradiochromatogramm derselben Mischung,
nach selektiver Hämolyse; Inkubationszeit 40
Minuten.

$\beta/\beta + \gamma$ Syntheseverhältnis = 0.

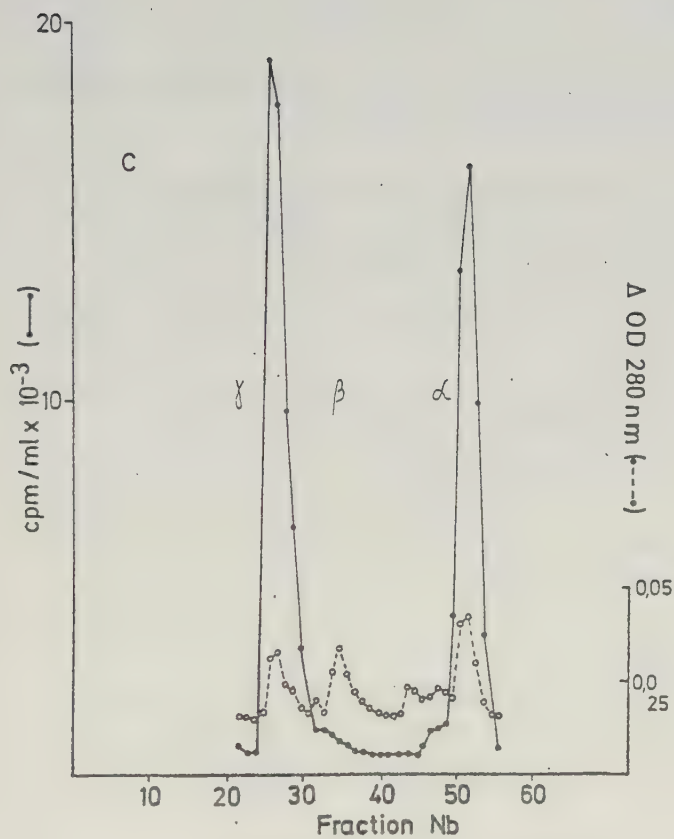


Abb. 14: Globinradiochromatogramm der rein fetalen Blutprobe.

$\beta/\beta + \gamma$ Syntheseverhältnis = 0.

Die gestrichelte Linie (o--o) zeigt die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen an.

4. Diskussion

4.1. Selektive Hämolyse in einer mit Erwachsenenerythrozyten kontaminierten fetalen Blutprobe

Infolge der unterschiedlichen Carboanhydraseaktivität und - Konzentration in Erwachsenenerythrozyten und fetalen Erythrozyten und des unterschiedlichen Permeabilitätsverhaltens des Carboanhydrasehemmers Azetazolamid, erfolgte die durch NH_4^+ , Cl^- , HCO_3^- hervorgerufene Hämolyse in Erwachsenenerythrozyten schneller als in den fetalen Erythrozyten. Eine dadurch bedingte selektive Hämolyse in einer mit Erwachsenenerythrozyten vermischten fetalen Blutprobe konnte in allen Experimenten reproduzierbar durchgeführt werden. Die Erwachsenenerythrozyten hämolysierten nach 40 Min. Inkubationsdauer nahezu vollständig, während vom Anteil der fetalen Erythrozyten zwischen 60 % und 90 % der Ursprungsmenge unversehrt geblieben sind. Die durchgeführten Versuchsreihen haben gezeigt, daß die selektive Hämolyse dazu benutzt werden kann, fetale Erythrozyten aus einer Mischblutprobe zu isolieren.

4.1.1 Diskussion der Nachweismethoden

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von insgesamt vier voneinander unabhängigen Methoden nachgewiesen, daß eine Mischblutprobe in einem entsprechenden Inkubationsmedium selektiv hämolysiert werden kann.

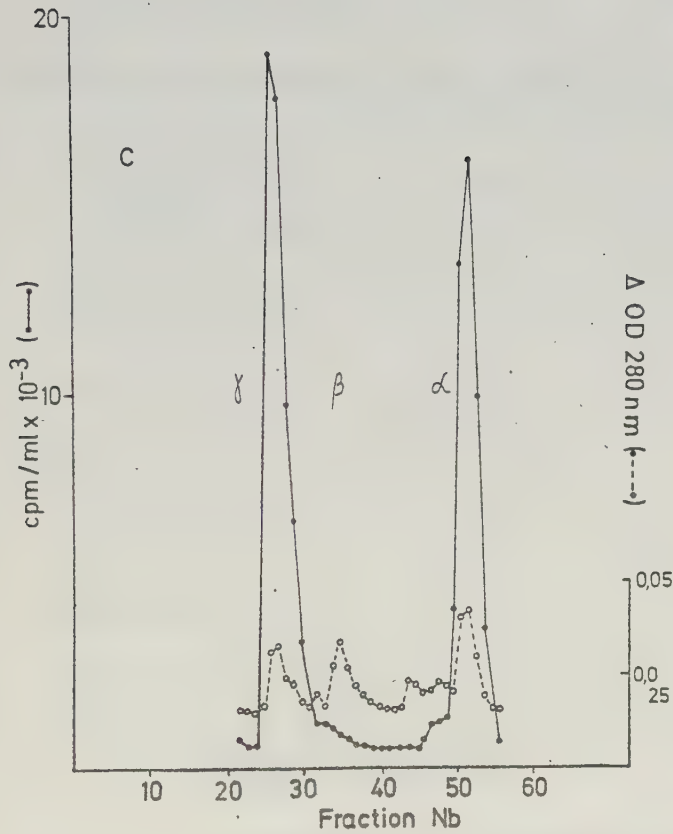


Abb. 14: Globinradiochromatogramm der rein fetalen Blutprobe.

$\beta/\beta + \gamma$ Syntheseverhältnis = 0.

Die gestrichelte Linie (o---o) zeigt die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen an.

4. Diskussion

4.1. Selektive Hämolyse in einer mit Erwachsenenerythrozyten kontaminierten fetalen Blutprobe

Infolge der unterschiedlichen Carboanhydraseaktivität und - Konzentration in Erwachsenenerythrozyten und fetalen Erythrozyten und des unterschiedlichen Permeabilitätsverhaltens des Carboanhydrasehemmers Azetazolamid, erfolgte die durch NH_4^+ , Cl^- , HCO_3^- hervorgerufene Hämolyse in Erwachsenenerythrozyten schneller als in den fetalen Erythrozyten. Eine dadurch bedingte selektive Hämolyse in einer mit Erwachsenenerythrozyten vermischten fetalen Blutprobe konnte in allen Experimenten reproduzierbar durchgeführt werden. Die Erwachsenenerythrozyten hämolysierten nach 40 Min. Inkubationsdauer nahezu vollständig, während vom Anteil der fetalen Erythrozyten zwischen 60 % und 90 % der Ursprungsmenge unversehrt geblieben sind. Die durchgeführten Versuchsreihen haben gezeigt, daß die selektive Hämolyse dazu benutzt werden kann, fetale Erythrozyten aus einer Mischblutprobe zu isolieren.

4.1.1 Diskussion der Nachweismethoden

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von insgesamt vier voneinander unabhängigen Methoden nachgewiesen, daß eine Mischblutprobe in einem entsprechenden Inkubationsmedium selektiv hämolysiert werden kann.

4.1.1.1 Betke-Kleihauer Färbung

Es zeigte sich, daß die Betke-Kleihauer Färbung (20) nach einer selektiven Hämolyse mit Vorsicht anzuwenden ist. Auf den Ausstrichen, auf denen die nach der Inkubation übriggebliebenen Zellen zu sehen waren, konnte man Membranfragmente hämolysierter Erythrozyten erkennen, die nur mit großer Schwierigkeit von den Erwachsenenerythrozyten, bzw. den fetalen Erythrozyten zu unterscheiden waren. Die Ergebnisse, die mit dieser Färbung erzielt wurden, stimmten jedoch mit denen, die durch andere Methoden gewonnen wurden, überein.

4.1.1.2 Isoelektrische Fokussierung

Mit der Isoelektrischen Fokussierung steht eine Methode zur Verfügung, die einen qualitativ und quantitativ genauen Nachweis der Hämoglobine gewährleistet.

4.1.1.3 Markierung der Erythrozyten mit ^3H Leuzin und ^{14}C Leuzin

Mit dieser Methode werden Erwachsenenerythrozyten und fetale Erythrozyten unterschieden. Unter den Bedingungen der pränatalen Diagnostik eines β -Thalassämie ist dieses Nachweisverfahren für Erwachsenenerythrozyten und fetale Zellen nicht anwendbar. Zur Diagnosestellung einer β -Thalassämie ist schon eine Präinkubation der Erythrozyten zur markierten Globinsynthese in vitro notwendig, da durch Aktivitätsmessung überprüft wird, ob der der β -Thalassämie zugrunde liegende

genetische Defekt, nämlich eine reduzierte β -Globinsynthese, in der zu untersuchenden fetalen Blutprobe vorhanden ist. Eine zusätzliche Markierung der Erythrozyten würde das Ergebnis verfälschen.

4.1.1.4 Kontinuierliche Registrierung der Hämolyse

Diese Methode ist nur für analytische Zwecke geeignet, da zur Herstellung eines Hämatokrits von 1,5 Vol.% der zu untersuchenden Blutprobe so große Volumina notwendig sind, daß sie das Fassungsvermögen der Photometerküvetten überschreiten. In die Inkubationslösung wurde die Menge der zugesetzten NH_4HCO_3 -Lösung auf das Zehnfache erhöht. Dies führte zu einer beschleunigten Hämolyse der Erwachsenenerythrozyten, die nach 2 Minuten Inkubationsdauer nahezu völlig hämolysiert waren, während die fetalen Zellen nach 5 Minuten Inkubationsdauer noch unversehrt waren.

4.1.2 Ausbeute an fetalen Erythrozyten

In den Experimenten, die in den Abbildungen 6,7,8 zusammengefaßt sind, wurden Erwachsenenerythrozyten und Neugeborenenerythrozyten inkubiert. Die Ausbeute an Neugeborenenerythrozyten nach der experimentell bestimmten besten Inkubationsdauer, nämlich 40 Minuten, variierte zwischen 60% und 90% der Ursprungsmenge. Diese mit den Werten der Hämolyserate der Erwachsenenerythrozyten verglichene relativ unterschiedliche Ausbeute, ist wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Carboanhydraseaktivitäten und Konzentrationen der Neugeborenen- bzw. der Erythrozyten von

Frühgeborenen zurückzuführen (12, 36).

Vergleicht man unsere Ergebnisse mit der Arbeit von Boyer et al. (4) so besitzt die Anwendung unserer Methode der selektiven Hämolyse den Vorteil einer einfacheren und schnelleren Durchführbarkeit. Wir verzichteten absichtlich auf die Verwendung eines Ficoll-Gradienten, mit dessen Hilfe aus einer Blutprobe durch 24 stündige Sedimentation die Erythrozyten abgetrennt werden können.

Ebenso verzichteten wir auf den Nachweis der fetalen Erythrozyten nach der Inkubation mit Hilfe einer Antigen - Antikörperreaktion mittels Anti-hb-F Serum, da gutes Anti-hb-F Serum selten und die Ausarbeitung der Reaktionsbedingungen schwierig ist.

Im Vordergrund stand die Frage nach der Dauer und der Einfachheit einer selektiven Hämolyse, besonders im Hinblick auf die Anwendung der Methode in der pränatalen Diagnostik. Mit der hier verwendeten Methode wurden zwar nicht so hohe Anreicherungs-fakten erzielt wie bei Boyer et al., doch genügte die Anreicherung bei uns noch bei Blutproben mit einem Anteil an fetalen Erythrozyten von 6,25 %.

4.1.3 Selektive Hämolyse in der Praxis

Bei der Anwendung der selektiven Hämolyse bei einem Fall in der pränatalen Diagnostik wurden absichtlich die mittels Fetoskopie gewonnenen fetalen Erythrozyten mit den mütterlichen Erythrozyten so vermischt, daß die Mischprobe nur 6,25 % fetale Erythrozyten enthielt.

Eine lediglich aus fetalen Erythrozyten bestehende Probe und eine nur aus mütterlichen Zellen bestehende Probe dienten als Kontrolle. Diese Kontrolle war notwendig, um das durch die selektive Hämolyse erhaltene Ergebnis zu bestätigen, und uns die Sicherheit zu geben, bei eventuellem Scheitern unseres Experiments die durch Fetoskopie erhaltenen Erythrozyten nicht vollständig verworfen zu haben. In diesem Experiment wurden die Bedingungen so gestellt, wie es sein könnte, wenn eine durch Fetoskopie gewonnene fetale Blutprobe mit mütterlichen Erythrozyten kontaminiert wäre. Die Ergebnisse der Untersuchungen der künstlich hergestellten Mischblutproben, sowie die der Kontrollblutproben bestätigen, daß eine selektive Hämolyse bei einer mit Erwachsenenerythrozyten vermischten fetalen Blutprobe durchführbar ist. Ebenfalls konnte in diesem Experiment nochmals gezeigt werden, daß eine Präinkubation der Erythrozyten mit radioaktiven Aminosäuren eine anschließende Differentialhämolyse nicht beeinflusst.

Bis jetzt konnte eine pränatale Diagnose der Thalassämie oder der Sichelzellanämie an Feten mit Risiko in einem gewissen Prozentsatz der Fälle nicht gestellt werden (1, 26),

da die gewonnene Blutprobe unbrauchbar war.

Es ist zu erwarten, daß der Prozentsatz der Fehlversuche mit Anwendung der selektiven Hämoanalyse gesenkt werden kann, wenn eine mit mütterlicher Erythrozyten vermischte Blutprobe untersucht werden soll.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Erwachsenen-erythrozyten in einer mit fetalen Erythrozyten vermischten Blutprobe selektiv hämolysiert und damit fetale Zellen isoliert werden können und sich diese Methode in der pränatalen Diagnostik genetisch bedingter Anämien anwenden läßt.

Das Interesse an einer Trennung solcher Mischungen besteht in der pränatalen Diagnostik von genetisch bedingten Anämien, da die für diese Untersuchung notwendige fetale Blutprobe aus technischen Gründen sehr häufig mit mütterlichen Erythrozyten kontaminiert ist.

Es wurden die Hämolysieraten von Erwachsenenerythrozyten und Neugeborenenerythrozyten in einem $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{HCO}_3$ haltigem Medium bestimmt. Weiter wurde der Einfluß des Carboanhydrasehemmers Azetazolamid auf die Hämolysieraten der Zellen untersucht. Anschließend wurde das Verhalten von Proben, in denen sowohl Erwachsenen- als auch Neugeborenenerythrozyten enthalten waren, während der Inkubation untersucht. Es wurden Bedingungen ausgearbeitet, unter denen nach 40 Minuten Inkubationsdauer die Erwachsenenerythrozyten nahezu vollständig hämolysiert waren, während vom Anteil der fetalen Zellen zwischen 60 % und 90 % der Ursprungsmenge unverseht geblieben sind.

Schließlich wurde bei einer aus Norditalien stammenden Schwangeren, bei der aufgrund der Familienanamnese das Risiko auf homzygote β -Thalassämie ihres Feten bestand, eine pränatale Diagnostik mit Anwendung der selektiven Hämolyse durchgeführt. Ebenfalls durchgeführte Kontrolluntersuchungen bestätigten die erfolgreiche Anwendung der Methode der selektiven Hämolyse.

6. Literaturverzeichnis

- 1.) Alter B.P., Modell C.B., Fairweather D., Hobbins J.C., Mahoney M.J., Frigoletto F. D., Sherman A.S. and Nathan D.G.: Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies. N.Engl.J.Med. 295,1437 1976
- 2.) Bank A. und O'Donnell J.: Intracellular loss of free α - chains in β -thalassemie. Nature 222, 295, 1969
- 3.) Benzie R.J. und Doran T.A.: The "fetoscope" - A new clinical tool for prenatal genetic diagnosis Am. J. Obstet. Gynecol. 121, 460, 1975
- 4.) Boyer S.H., Noyes A.N., Boyer M.L.: Enrichment of erythrocytes of fetal origin from adult - fetal blood mixtures via selective hemolyses of adult blood cells: an aid to antenatal diagnosis of hemoglobinopathies. Blood 47, 883, 1976
- 5.) Clegg J.B., Naughton M.A. and Weatherall D.J.: Abnormal Human hemoglobins: Separation and Characterisation of the α - and β -chains by chromatography, and the determination of two new variants. Hb Chesapeake and Hb J (Bangkok). J. Mol. Biol. 19, 91, 1966
- 6.) Clegg J.B. und Weatherall D.J.: Haemoglobin synthesis during erythroid maturation in β -Thalassemia. Nature (New Biol.) 240, 190, 1972
- 7.) Cividalli G., Nathan D.G., Kan Y.W., Santamarina B., and Frigoletto F.: Relationship of beta to gamma synthesis during the first trimester. An approach to prenatal diagnosis thalassemia. Ped. Res. 8, 553, 1974

- 8) Chalevelakis G., Clegg J.B. und Weatherall D.J.:
Imbalanced globin chains synthesis in heterozygous
 β -thalassemic bone marrow.
Pro. Nat. Acad. Sci. 72, 3853, 1975
- 9) Drysdale T.W., Righetti P. and Bunn H.F.:
The separation of human and animal hemoglobins by
isoelectric focusing in polyacrylamide gel.
Biochem. Biophys. Acta 229, 42, 1971
- 10) Fine J.M., Boffa G.A., Charrel M. et al.: Immuno-
logical and starch - gel electrophoresis studies of the
carbonic anhydrase X_1 , X_2 and Y isolated from human
erythrocyte haemolysates.
- 11) Funakoshi S. und Deutsch H.F.: Human carbonic anhydrase.
Immunochemical studies.
J. Biol. Chem. 245, 2852 - 2856, 1970
- 12) Funakoshi S. and Deutsch H.F.: Human carbonic
anhydrases. V. Levels in erythrocytes in various states.
J. Lab. Clin. Med. 77, 39, 1971
- 13) Gill F.M. und Schwartz E.: Free α - globin pool
in human bone marrow.
- 14) Golbus M.S., Kan Y.W. und Naglich - Craig M.:
Fetal Blood sampling in midtrime pregnancies.
Am. J. Obstet. Gynecol. 124, 653, 1976
- 15) Huelms E.R., Dance N., Shooter E.M. und Beaven G.H.:
The preparation and properties of hemoglobin α^A ,
 α - Hemoglobin consisting of α^A -polypeptide chains.
J. Mol. Bio. 5, 511, 1962
- 16) Heywood J.B., Karon M. und Weissman S.:
Amino acids: Incorporation into α - and β -chains
of hemoglobin by normal and thalassemic reticulocyten.
Science 146, 530, 1964

- 17) Hobbins J.C. und Mahoney M.J.: In utero diagnosis of hemoglobinopathies. Technic for obtaining fetal blood.
N. Engl. J. Med., 290, 1065, 1974
- 18) Jacobs M.H. and Stewart D.R.: The role of carbonic anhydrase in certain ionic exchanges involving the erythrocyte.
- 19) Jensen M. und Zahn V.: Fetoskopie, eine neue Methode in der pränatalen Diagnostik.
Münchn. Med. Wschr. 118, 625, 1976
- 20) Kleihauer E., Braun H. und Betke K.: Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrozyten eines Blutaussstrichs.
Klin. Wschr. 35, 635, 1957
- 21) Khalifah R. G.: The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B. and C.
J. Biol. Chem. 246, 2561 - 2573, 1971
- 22) Kazazian, H.H.: Regulation of fetal hemoglobin production. Sem. Hemotol 11, 525, 1974
- 23) Kan Y.W., Nathan D. G., Cividalli G. und Crookston M.: Concentration of fetal red blood cells from a mixture fetal and maternal blood by anti-fetal serum: an aid to prenatal diagnosis of hemoglobinopathies.
Blood 43, 411, 1974
- 24) Kan Y.W., Golbus M.S., Trekartin R., Furbetta M. and Cao A.: Prenatal diagnosis of homozygous β -thalassemia.
Lancet II, 790, 1975

- 25) Kan Y. W. und Golbus M.S.: Prenatal diagnosis of hereditary hemoglobin disorders: Current Developements. Ped. Res. 10, 367, 1976
- 26) Kan Y.W., Golbus M.S., Trecartin R.F., Filly R.A., Valenti C., Furbetta M. und Cao A.: Prenatal diagnosis of β -Thalassemie and Sickle Cell Anemia, Experience with 24 cases. Lancet 1, 8006, 1977
- 27) Matsaniotis, N. und C. Kattamis: Thalasseмииs, a social problem in freece Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 49, 223, 1969
- 28) Maren T.H. and Wiley C.E.: Kinetics of carbonic anhydrase in whole red cells as measured by transfer of carbon dioxide and ammonia. Mol. Pharmacol. 6, 430, 1970
- 29) Merck E: Klinisches Labor Darmstadt
- 30) Nyman P.O.: Purification and properties of carbonic anhydrase from human erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta 52, 1 - 12, 1961
- 31) Ørskov S.L.: Über die Bedeutung der Kohlensäure für die Diffusion der Ammoniumsalze durch die Blutkörperchenmembran. Pfluegers Arch 231, 690, 1933
- 32) Ørskov S.L.: Weitere Untersuchungen über den Einfluß der Kohlensäure auf die Permeabilität der Ammoniumsalze. Biochem. Z. Berlin, 269, 349, 1934

- 33) Rickli E.E., Ghazanfar S. A. S., Gibbons B. H. et al.:
Carbonic anhydrase from human erythrocytes. Preparation
and properties of two enzymes.
J. Biol. Chem. 239, 1065-1078, 1964
- 34) Schroeder, "A. Shelton, J.B. Cormick, J.,
Jones, R.T.:
The amino acid sequence of γ -chain of human foetal
hemoglobin.
Biochem. 2, 992, 1963
- 35) Schwartz E.: Abnormal globin synthesis in thalassemic
red cells.
Sem. Hematol. 11, 549, 1974
- 36) Sell J.E. and Petering H.B.: Carbonic anhydrases
from human neonatal erythrocytes.
J. Lab. Clin. Med. 84, 369, 1974
- 37) Siegenthaler: Klinische Pathophysiologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- 38) Weatherall D.J., Clegg J.B., Na-Nakern S. und
Wasi P.: The pattern of disordered hemoglobin syn-
thesis in homozygous and heterozygous β -Thalassemia.
Brit. J. Haemat. 16, 251, 1969
- 39) Weatherall D.J. und Clegg J.B.: The Thalassemia
Syndromes.
2. Ausg. Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1972
- 40) Wood, W.G. und D.J. Weatherall:
Hemoglobin synthesis during human fetal development.
Nature 244, 162, 1973

- 41) Wood W.G. und Stamatoyannopoulos: Globin synthesis in fractionated normoblasts of β -thalassemie heterozygotes.
J. Clin. Invest. 55, 567, 1975
- 42) Yatanagas X. und Fessas P.: The pattern of hemoglobin precipitation in thalassemia and its significance.
Ann. N. J. Acad. Sci. 165, 270, 1969

L E B E N S L A U F

Zur Person : Geboren am 13.Juni 1951 in München
als Sohn der Hausgehilfin Maria Kuchler
und des Metzgermeisters Alfons Nemmer;
deutsche Staatsangehörigkeit.

1957 - 1962 Volksschule Unterhaching bei München

1962 - 1971 Besuch des Maria-Theresia Gymnasiums
in München mit Erwerbung des Reifezeug-
nisses für das Mathematisch - naturwis-
senschaftliche Gymnasium.

1971 - 1972 Ableistung des Grundwehrdienstes bei
der Bundeswehr;

1972 - 1974 Studium der Chemie/Physik an der Univer-
sität München.

1974 - 1975 Beginn des Medizinstudiums an der Ruhr-
Universität in Bochum.

1975 Ärztliche Vorprüfung

1975 - 1979 Fortführung des Medizinstudiums an der
Universität München.

1976 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1978 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1979 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1979 Antritt einer Assistentenstelle in der
chirurgischen Abteilung des Knappschafts-
krankenhauses in Hausham.

